UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

401

G. PICCI - Z. MÉLAS-JOANNIDIS - A. CARNIS - G. VASSILATOS

ANCORA SOPRA LA MICROFLORA PRESENTE NEI MOSTI D'UVA DEL PELOPONNESO

(Nota III)

Estratto dagli « *Annali Facoltà di Agraria* » - Vol. XX - 1959

EDITRICE GIARDINI - PISA

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
18 MAR 1960

Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia Agraria e Tecnica

G. Picci - Z. Mélas-Joannidis - A. Carnis - G. Vassilatos

ANCORA SOPRA LA MICROFLORA PRESENTE NEI MOSTI D'UVA DEL PELOPONNESO (*)

(Nota III)

Precedenti ricerche

In precedenza abbiamo riferito intorno alla microflora rinvenuta presente nei mosti d'uva di Grecia durante gli anni 1955 e 1956 (1, 2).

Ritenendo utile proseguire quelle ricerche, analoghe indagini sono state compiute durante il 1957.

E' sui risultati di tali indagini che qui si riferisce.

Prima di entrare nel merito varrà peraltro la pena di ricordare riassuntivamente le conclusioni relative le prime ricerche.

Nel 1955 furono isolati e studiati oltre cento ceppi di lieviti rinvenendosi le specie seguenti: *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekker, *Sacch. oviformis* Ost., *Sacch. italicus* Cast., *Sacch. rouxii* Boutroux, *Sacch. rosei* (Guill.) Lodder et Kreger-van Rij, *Sacch. carlsbergensis* Hansen, *Sacch. kluyveri* Phaff et al., *Pichia fermentans* Lodder, *P. membranaefaciens* Hansen, *Torulopsis bacillaris* (Kr. et Kr.) Lodder, *Kloeckera apiculata* (Reess) Janke. Tra queste specie particolarmente frequenti risultarono, a parte *Sacch. ellipsoideus*, *Sacch. carlsbergensis* e *Sacch. kluyveri*.

Di ogni specie fu saggiato il potere alcooligeno e la formazione di acidità volatile. Con riferimento alle specie dominanti quella più alcooligena si dimostrò *Sacch. ellipsoideus*, seppure con una certa variabilità di comportamento, seguita nell'ordine da *Sacch. carlsbergensis* e *Sacch. kluyveri*. Finalmente, in ceppi rappresentativi di ogni specie fu studiata la resistenza offerta all'alcool etilico in rapporto a varie temperature ed eseguiti saggi di carattere auxologico.

(*) Lavoro eseguito in collaborazione con l'*Institut Pasteur Hellènique* di Atene.

Nel 1956 furono isolati e studiati 170 ceppi provenienti da mosti prelevati alli'nizio, durante e alla fine della fermentazione tumultuosa. Le specie rinvenute furono: *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekker, *Sacch. oviformis* Ost., *Sacch. carlsbergensis* Hansen, *Sacch. rouxii* Boutroux, *Sacch. exiguus* Hansen, *Sacch. fermentati* (Saito) Lodder et Kreger-v. Rij, *Sacch. delbrückii* Lindner, *Sacch. florentinus* (Cast.) Lodder et Kreger-v. Rij, *Sacch. fructuum* Lodder et Kreger-v. Rij, *Sacch. rosei* (Guill.) Lodder et Kr.-v. Rij, *Sacch. veronae* Lodder et Kreger-v. Rij, *Hansenula anomala* (Hansen) H. et Sydow, *Pichia fermentans* Lodder, *Kl. apiculata* (Reess) Janke, *Kl. magna* (de' Rossi) Janke, *Candida krusei* (Cast.) Basgal, *C. pucherrima* (Lindner) Wind., *C. tropicalis* (Cast.) Berkh., *C. solani* Lodder et Kr.-v. Rij, *C. melinii* Diddens et Lodder, *Rhodotorula mucilaginosa* (Jorg.) Harrison, *Trichosporon hellenicum* Ver. et Picci (3).

Molte di queste specie furono peraltro isolate pochissime volte, in alcuni casi una sola volta, tanto che la loro presenza fu ritenuta assolutamente occasionale.

Confrontando questi reperti con i precedenti fu osservato come alcune specie allora presenti e forse dominanti non siano state isolate.

Ad ogni modo, all'inizio del processo fermentativo furono visti dominare i lieviti apiculati (con prevalenza di *Kl. magna* su *Kl. apiculata*) e altre specie la cui presenza si è detta occasionale. In questo primo momento gli ellittici e gli zigosaccaromiceti non raggiungono il 30% del totale.

In fase di fermentazione violenta il numero degli apiculati diminuisce ed aumenta considerevolmente, invece, *Sacch. ellipsoideus* insieme a *Sacch. oviformis, Sacch. carlsbergensis* e al gruppo degli zigosaccaromiceti.

Al termine della fermentazione, gli isolamenti effettuati dimostrarono, finalmente, la dominanza dell'ellittico e l'aumento di *Sacch. oviformis* e *Sacch. carlsbergensis.*

Anche in questo secondo gruppo di ricerche di ogni specie e ceppo fu determinato il potere alcooligeno e la formazione di acidità volatile.

Risultati delle presenti ricerche

Metodi

Per quanto si riferisce ai metodi seguiti essi si riportano, fondamentalmente, a quelli già adottati in precedenza. Come allora la ricerca si portò su vari mosti prelevati nei tre momenti tipici della fermentazione.

Per gli isolamenti si è seguito la normale tecnica delle diluizioni in capsule Petri allesite con agar-malto ed incubate in stufa. Gli isolamenti sono stati effettuati a caso, scegliendo peraltro le colonie dominanti e più tipiche.

TAB. I — *Elenco dei ceppi isolati dalle varie provenienze*

Regione o Località	Vitigno	Isolamenti effettuati		
		Prima della fermentazione	Nel corso della fermentazione	A fine della fermentazione
Dervenakia	Alepou	1-I-a Candida pulcherrima 1-I-b Klocckera apiculata 1-I-c Kl. magna 1-I-d Kl. magna	1-II-a Kl. magna 1-II-b Pichia fermentans 1-II-c Kl. magna 1-II-a' Sacch. italicus 1-II-b' Sacch. italicus 1-II-b'$_1$ P. fermentas 1-II-e' Sacch. italicus	
Dervenakia	Alepou rosso	2-I-a Kl. magna 2-I-b Kl. magna 2-I-c Kl. magna	2-II-a Kl. apiculata 2-II-b Kl. magna 2-II-c Kl. magna	2-III-a Sacch. rosei 2-III-b Sacc. rosei 2-III-d Sacch. rosei
Dervenakia	Stafida	3-I-a Candida pulcherrina 3-I-b Candida pulcherrinaa 3-I-c Kl. apiculata	3-II-a Cand. pulcherrima 3-II-b Cand. pulcherrima 3-II-c Cand. pulcherrima 3-II-d Cand. pulcherrima	3-III-a Kl. apiculata 3-III-b Kl. apiculata 3-III-c Kl. apiculata
Kato Diminio	Savatiano	4-I-a Kl. apiculata 4-I-b Cand. pulcherrina 4-I-c Kl. apiculata 4-I-d Kl. apiculata	4-II-a Kl. apiculata 4-II-b Kl. apiculata 4-II-c Kl. apiculata	4-III-a Kl. magna 4-III-b P. membranaefaciens 4-III-c Kl. magna
Derveni	Rhoditis	5-I-a Kl. apiculata 5-I-b Kl. magna 5-I-c Kl. apiculata 5-I-d Kl. magna	5-II-a Kl. magna 5-II-b Kl. magna 5-II-c Kl magna	5-III-a Sacch. ellipsoideus 5-III-b Sacch. ellipsoideus 5-III-c Sacch. ellipsoideus 5-III-d Sacch. ellipsoideus
Selianitica	Rhoditis	6-I-c Kl. magna	6-II-a Kl. magna 6-II-b Kl. apiculata 6-II-c Kl. magna	6-III-a Sacch. oviformis 6-III-b Sacch. ellipsoideus 6-III-c Sacch. oviformis
Selianitica	Savatiano	7-I-a P. fermentans 7-I-b Kl. apiculata 7-I-c Kl. apiculata	7-II-a P. fermentans 7-II-b Kl. magna 7-II-c Kl. magna 7-II-d P. fermentans	7-III-a P. fermentans 7-III-b Sacch. ellipsoideus 7-III-c P. fermentans 7-III-d Sacch. ellipsoideus
Voulomeno	Mavroudi	8-I-a Kl. apiculata 8-I-b Kl. magna 8-I-c Kl. magna 8-I-d Trichosporon beherendii	8-II-a Kl. magna 8-II-b Kl. magna 8-II-c Cand. pulcherrima 8-II-a' P. membranaefaciens 8-II-b' Kl. apiculata 8-II-c' Kl. apiculata 8-II-d' Cand. pulcherrima 8-II-e' Cand. pulcherrima	8-III-c Kl. magna

(*segue*)

(*cont. della pag. prec.*)

Regione o Località	Vitigno	Isolamenti effettuati		
		Prima della fermentazione	Nel corso della fermentazione	A fine della fermentazione
Patrasso	Moscato			9-III-a Sacch. oviformis 9-III-b Sacch. ellipsoideus 9-III-c Sacch. ellipsoideus
Patrasso	Stafida			10-III-a Sacch. ellipsoideus 10-III-c Sacch. ellipsoideus 10-III-d Sacch. ellipsoideus
Patrasso	Moscato 1			11-III-a Sacch. ellipsoideu 11-III-b Sacch. ellipsoideus 11-III-c Sacch. ellipsoideus 11-III-c' Sacch. ellipsoideus 11-III-d Sacch. ellipsoideus 11-III-e Sacch. ellipsoideus
Patrasso	Rhoditis	12-I-a Kl. apiculata 12-I-c P. fermentans 12-I-c' P. fermentans	12-II-a Sacch. carlsbergensis 12-II-b Sacch. fructuum 12-II-d Sacch. ellipsoideus	12-III-a Sacch. ellipsoideus 12-III-b Sacch. ellipsoideus 12-III-c Sacch. ellipsoideus 12-III-d Sacch. ellipsoideus
Patrasso	Mavrodaphni	13-I-a Kl. magna 13-I-b Kl. jensenii 13-I-c Kl. magna 13-I-e Sacch. ellipsoideus	13-II-a Sacch. ellipsoideus 13-II-b Sacch. ellipsoideus 13-II-c Sacch. fructuum 13-II-d Sacch. ellipsoideus	13-III-a Sacch. ellipsoideus 13-III-b Sacch. apculata 13-III-d Sacch. ellipsoideus
Achaia	Mavrodaphni			14-III-a P. fermentans 14-III-a' P. membranaefaciens 14-III-b Sacch. ellipsoidens 14-III-c P. fermentans 14-III-d P. membranaefaciens
Achaia	Rhoditis		15-II-a Sacch. ellipsoideus 15-II-b Sacch. ellipsoideus 15-II-c Sacch. ellipsoideus 15-II-d Sacch. ellipsoideus	15-III-a Sacch. oviformis 15-III-b Sacch. carlsbergensis 15-III-c Sacch. carlsbergensis 15-III-d Sacch. oviformis
Olimpia	Phileri	16-I-b Kl. apiculata	16-II-a Kl. apiculata 16-II-c Cand. pulcherrima	16-III-a Kl. apiculata 16-III-b Sacch. rosei 16-III-c Sacch. veronae
Nèmèa	Asproudi	17-I-a Kl. apiculata 17-I-b Kl. apiculata 17-I-c Kl. apiculata 17-I-d Kl. apiculata	17-II-a Sacch. oviformis 17-II-b Sacch. ellipsoideus 17-II-c Sacch. ellipsoideus	17-III-a Sacch. ellipsoideus 17-III-b Sacch. ellipsoideus 17-III-c Sacch. ellipsoideus 17-III-d Sacch. italicus
Nèmèa	Mavroudi	18-I-a Kl. apiculata 18-I-b P. fermentans 18-I-c C. pulcherrima 18-I-d Kl. apiculata	18-II-a Sacch. carlsbergensis 18-II-b Sacch. ellipsoideus 18-II-c Sacch. oviformis	18-III-a Sacch. carlsbergensis 18-III-b Sacch. steineri 18-III-c Sacch. ellipsoideus 18-III-d Sacch. ellipsoideus

	bianca	19-I-b Cand. pulcherrima 19-I-c Kl. magna 19-I-d Cand. pulcherrima	19-II-b Sacch. ellipsoideus 19-II-c Sacch. ellipsoideus 19-II-d P. fermentans	19-III-b Sacch. ellipsoideu 19-II-c Sacch. oviformis 19-III-d Sacch ellipsoideus
Nèmèa	Alepou rossa	20-I-a Kl. magna 20-I-b Kl. magna 20-I-c Cand. pulcherrima 20-I-d Cand. pulcherrima	20-II-a Sacch. ellipsoideus 20-II-b Sacch. italicus 20-II-c Kl. apiculata 20-II-d Sacch. ellipsoideus	20-III-a Sacch. ellipsoideus
Achaia	Demestica rossa			21-III-a Sacch. oviformis 21-III-b Sacch. ellipsoideus 21-III-c Sacch. ellipsoideus 21-III-d Sacch. carlsbergensis 21-IIIe- Sacch. ellipsoideus
Achaia	Demestica bianca			22-III-a Sacch. ellipsoideus 22-III-b Sacch. ellipsoideus 22-III-c Sacch. ellipsoideus 22-III-d Sacch. ellipsoideus 22-III-e Sacch. ellipsoideus 22-III-f Sacch. ellipsoideus
Achaia	Sideritis			23-III-b Sacch. carlsbergensis 23-III-c Sacch. ellipsoideus

Indicazione dei ceppi secondo la Regione:

Corinzia
Dervenakia n. 1 a 3
Kato Diminio n. 4
Dervéni n. 5
Nèmèa n. 17 a 20

Eghialia
Sélianitica n. 6 e 7
Vouloméno n. 8

Patrasso
Patras n. 9 a 13
Achaia n. 14, 15, 21, 22, 23

Elide
Olympia n. 16

Come annotammo nelle ricerche precedenti è possibile che così procedendo qualche specie sia sfuggita all'isolamento. Il quadro zimologico presentato può quindi non apparire completo, soltanto da interpretarsi, quindi, come dominante. Da un punto di vista pratico è questo, del resto, che assume valore.

La diagnosi delle specie è stata condotta attraverso la ricognizione dei caratteri standard cui in Lodder e Kreger-van Rij. Uguali le tecniche.

Per le ricerche zimotecniche ci siamo valsi di un mosto contenente gr. 300 di zucchero per litro. Esso fu distribuito in ragione di cc 150 in matracci da cc 250, pastorizzato e seminato con i vari ceppi. La semina è stata effettuata con una sospensione di cellule provenienti da colture di 48 ore in mosto. La quantità dell'inoculo si è fatta corrispondere ad un numero di cellule pari a circa 3 x 10^8. Incubazione per 20 giorni a 26 °C.

Rilievi speciologici

I risultati dall'esame speciologico figurano nella Tab. I. In essa Tabella sono segnate anche le località ove i mosti furono prelevati e il vitigno che fornì le uve con le quali furono preparati i vari mosti.

Questa Tabella consente, in primo luogo, di fornire un elenco delle specie isolate e di calcolarne (come figura in Tab. II) la loro frequenza.

Tab. II - *Specie di lieviti rinvenuti, complessivamente, nei mosti e loro percentuali di frequenza su* 190 *ceppi.*

	%		%
1 Sacch. ellipsoideus	54(28.4)	10 Pichia membranaefaciens	4 (2.1)
2 Kl. apiculata	33(17.4)	11 Sacch. fructuum	2
3 Kl. magna	32(16.7)	12 » microellipsodes	1
4 Cand. pulcherrima	16(8.3)	13 » steineri	1
5 Pichia fermentans	13(6.8)	14 » transvaalensis	1
6 Sacch. oviformis	11(5.8)	15 » veronae	1
7 » calsbergensis	10(5.2)	16 Kloeckera jensenii	1
8 » italicus	5(2.6)	17 Trich. beherendii	1
9 » rosei	4(2.1)		

Sacch. ellipsoideus	**28,4%**
Kl. apiculata e magna	34.1 »
Altri Saccharomyces	15.2 »
P. fermentans e membranaefaciens .	8.9 »
Cand. pulcherrima	8.3 »
Altre specie	5.1 »

Ma più interessante, ai fini zimotecnici, è l'esame della Tab. III ove, le sopraricordate specie, sono ordinate in rapporto al momento del processo fermentativo nel quale furono isolate.

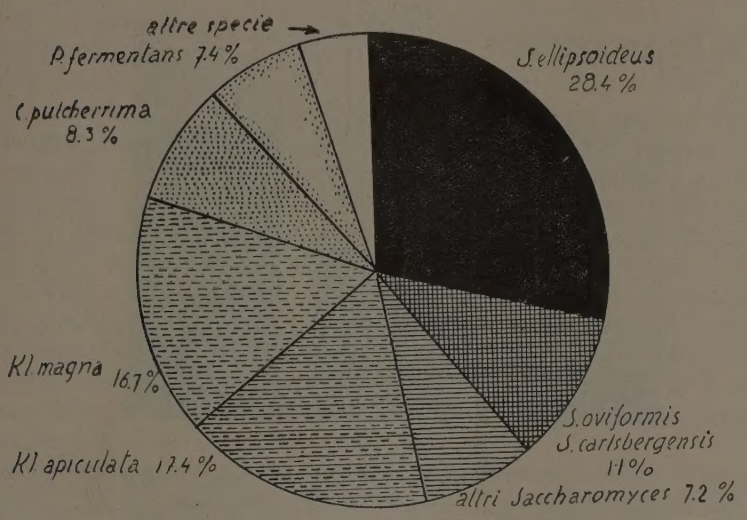

Fig. 1 - Distribuzione percentuale delle varie speie su 100 ceppi

Tab. III - *Specie di lieviti e loro frequenza nei vari momenti della fermentazione.*

Prima della fermentazione			Nel corso della fermentazione			Dopo fermentazione		
Specie	n.	%	Specie	n.	%	Specie	n.	%
Kl. apiculata	19	38	Kl. magna	13	20,9	S. ellipsoideus	41	52,4
Kl. magna	16	32	S. ellipsoideus	12	19,3	S. oviformis	8	10,3
Cand. pulcherrima	8	16	Kl. apiculata	9	14,5	S. carlsbergensis	6	7,7
P. fermentans	4	8	Cand. pulcherrima	8	12,9	Kl. apiculata	5	6.4
Kl. jensenii	1	2	P. fermentans	5	8,1	S. rosei	4	5.2
S. ellipsoideus	1	2	S. carlsbergensis	4	6,4	P. fermentans	4	5.2
Trich. beherendii	1	2	S. oviformis	3	4,9	S. membranaefaciens	3	3,8
	50	100	S. italicus	4	6,6	Kl. magna	3	3.8
			S. fructuum	2	3,2	S. italicus	1	2
			S. transvaalensis	1	1,6	S. microellipsodes	1	2
			P. membranaefaciens	1	1,6	S. steineri	1	2
				62	100	S. veronae	1	2
							78	100

Presente questa tabella e il grafico di fig. 2 nel quale, oltre ai dati relativi il 1957 sono stati sommarizzati i dati della precedente annata,

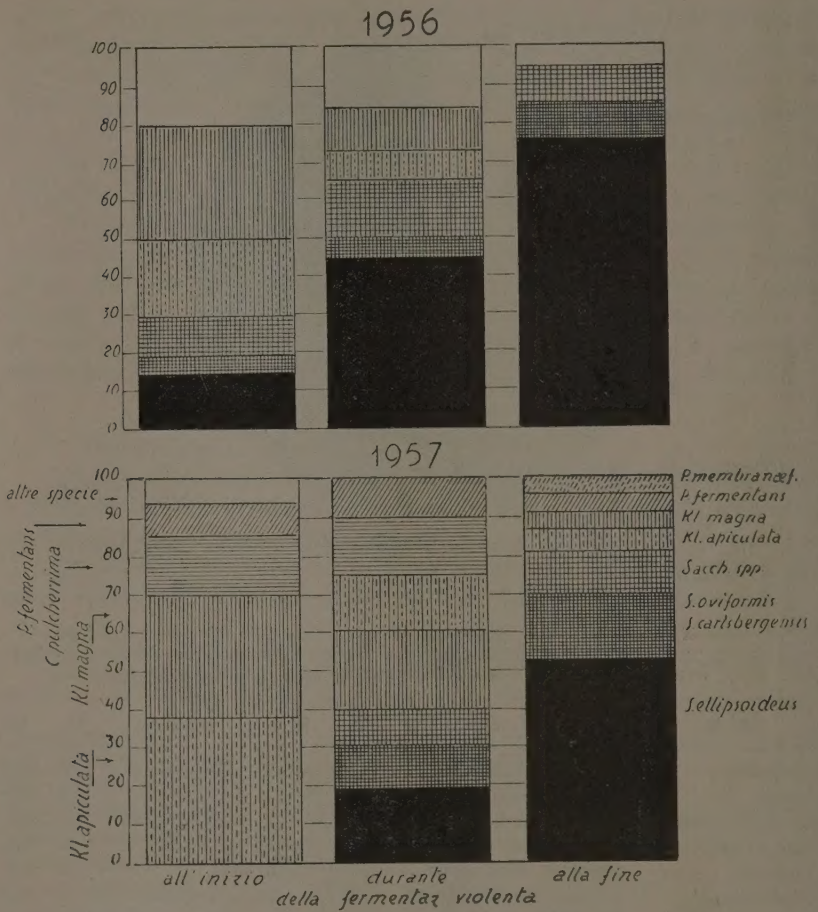

Fig. 2 - Le varie specie in tre diversi momenti della fermentazione.

si può osservare come, all'inizio del processo fermentativo siano presenti non molte specie e, come queste, siano rappresentate fino al 70% da lieviti apiculati; notevole, peraltro, la presenza di *Candida pulcherrima* (16%) e, successivamente, di *Pichia fermentans* (8%). Praticamente assente figura *Sacch. ellipsoideus* come altra specie di *Saccharomyces*.

Il rinvenimento in discreta percentuale di *Pichia fermentans* è di un certo interesse. E a questo riguardo non possiamo fare a meno di notare

come, lo stesso reperto — anzi in proporzioni maggiori — sia stato ottenuto da VERONA e ZARDETTO DE TOLEDO (4) per alcuni mosti della zona di S. Paolo in Brasile durante la stessa annata.

Durante il corso della fermentazione il quadro zimologico tende a migliorare, ma non sensibilmente. Compaiono, è vero, i lieviti ellittici e altri a metabolismo decisamente fermentativo, ma la loro percentuale non supera il 40% di fronte al 65% notato nel 1956. Persistono poi, in elevata misura, i lieviti apiculati (circa il 35% contro il 20% circa del 1956) come persiste *Pichia fermentans*.

Verso la fine della fermentazione il quadro zimologico decisamente migliora pur presentandosi qualitativamente e quantitativamente inferiore a quello dell'annata precedente. Salgono così le percentuali sia del lievito ellittico come di *Sacch. oviformis* e *carlsbergensis* oltre ad altri Saccaromiceti. Permangono peraltro, in misura non trascurabile, le specie di *Kloeckera* e di *Pichia*.

E si conclude rilevando, in primo luogo, il fatto — del resto noto — relativo la incostanza dei reperti da un anno ad un altro. In una annata compaiono certe specie, in altra annata compaiono altre; ed anche quelle più o meno costantemente presenti mutano quantitativamente la loro presenza. Il fatto, già si è detto, è sufficientemente noto, ma ancora oscure rimangono le cause che lo determinano. Può darsi — e l'idea è accettabile — che su di esso influiscano le condizioni termo-udometriche dell'anno; ma l'influenza di tali condizioni non è forse sufficiente, da sola, a spiegare esaurientemente la mutevolezza che si verifica nel quadro zimologico di una regione da un anno ad un altro.

Una seconda conclusione è la seguente. Mentre, nel 1956, esaminando la complessiva facies zimologica dei tre diversi momenti della fermentazione si potè concludere che essa appariva abbastanza soddisfacente ad un buon andamento del processo fermentativo, lo stesso non si può dire per la campagna del 1957. All'opposto, dovremmo concludere che il 1957 ha offerto un quadro zimologico relativamente poco soddisfacente.

Rilievi zimotecnici

Per ogni specie e ceppo sono state eseguite ricerche sul rendimento in alcool e sulla formazione di acidità volatile.

I dati relativi, che figurano nelle annesse Tabelle, consentono qualche commento.

Sacch. ellipsoideus

Su 54 ceppi esaminati il rendimento minimo e massimo in alcool è stato, rispettivamente, dell'11.6 e del 16.9% con un media di 13.2 ± 0.158%. Confrontato tale rendimento con i dati ottenuti nel 1955 e nel 1956 si osserva quanto segue:

1955	12.6 — 15.2	media:	13.6 ± 0.140%
1956	10.5 — 16.5	»	13.9 ± 0.128 »
1957	11.6 — 16.1	»	13.2 ± 0.158 »

Nell'ultimo anno si è avuto cioè un rendimento inferiore e statisticamente significativo almeno nei confronti del 1956, e questo nonostante il rendimento minimo sia apparso più elevato.

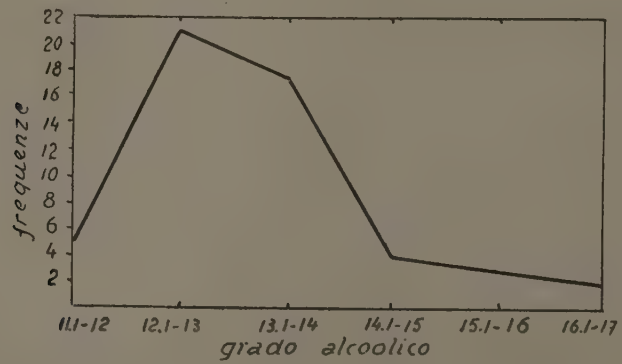

Fig. 3 - Il rendimento in alcool dei vari ceppi di S. *ellipsoideus*.

Per quanto si riferisce all'acidità volatile qui indicata in milleq. di ac. acetico per molecola di alcool i dati indicano:

1955		media:	3.10 ± 0.243
1956	2 — 8.5	»	5.20 ± 0.225
1957	1 — 12.—	»	6.20 ± 0.353

L'acidità volatile è stata quindi superiore a quella degli anni precedenti.

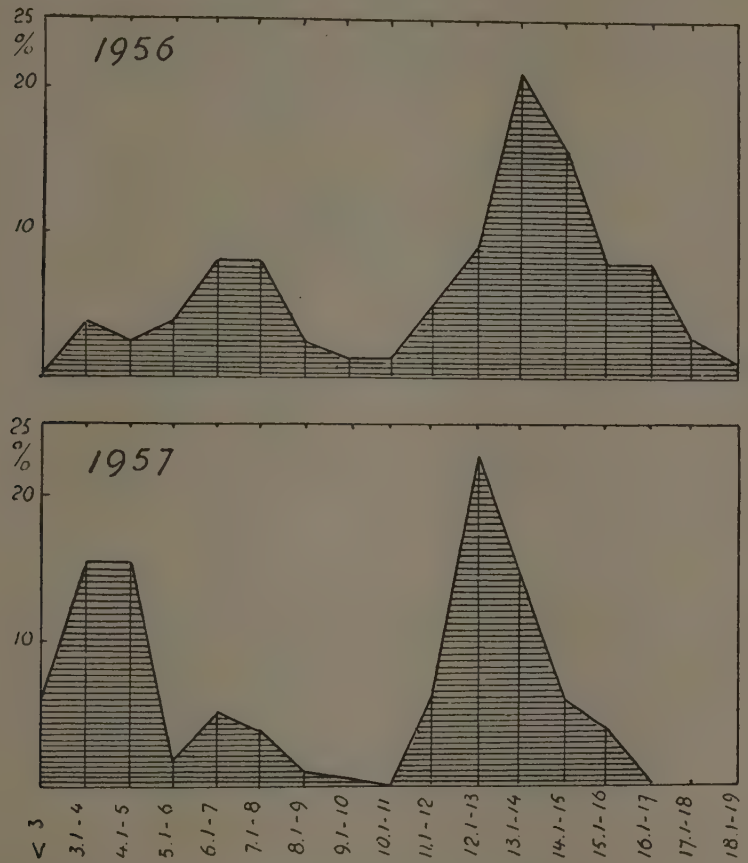

Fig. 4 - Distribuzione dei vari ceppi in relazione al loro potere alcooligeno. In ordinata le percentuali di frequenza in ascissa il rendimento alcoolico (in %).

Sacch. carlsbergensis

Questa specie riveste particolare interesse poichè, nel 1955, fu rinvenuta dominante (*). Non così nel 1956. Nel 1957 *Sacch. carlsbergensis* è di nuovo abbastanza rappresentato.

(*) Tale anche nei mosti di S. Paolo (Brasile) durante la campagna del 1957, secondo i rilievi di Verona e Zardetto de Toledo.

Furono esaminati 11 ceppi che dettero in media il 12.75 ± 0.260% di alcool e il 6.9 ± 0.787 di ac. volatile in milleq. per molecola alcool.

Questi dati indicano che il comportamento tecnologico di questa specie è stato, per i ceppi isolati nel 1957, non dissimile da quello rilevato negli anni precedenti.

Sacch. oviformis

Questa specie è apparsa più rappresentata che nei precedenti anni. Il suo rendimento alcoolico è stato però nel 1957 — come si è verificato per *Sacch. ellipsoideus* — un poco inferiore:

1956	12.4 — 15.3	media:	13.9 ± 0.456
1957	12 — — 14.4	»	13.2 ± 0.061

Niente da rilevare circa quanto si riferisce alla produzione di ac. volatile.

Altri Saccaromiceti

Il rinvenimento di altri Saccaromiceti non appare quantitativamente interessante. Se mai un poco più abbondante è apparso *Sacch. rosei* e *Sacch. italicus* prima d'ora non rinvenuto in Grecia.

Il rendimento in alcool e la produzione di ac. volatile non mostrano, per questi altri Saccaromiceti, nulla di diverso da quanto è noto .E' confermata ancora una volta la scarsa od anche molto scarsa produzione di ac. volatile da parte sia di *Sacch. rosei* che di *Sacch. veronae*.

Kl. apiculata

Nulla da rilevare circa *Kl. apiculata*, rinvenuta abbondante all'inizio della fermentazione e persistente anche durante lo svolgersi della stessa. Dei vari ceppi isolati ne sono stati studiati 21 che hanno dato in media il 4.16 ± 0.203% di alcool e il 17.04 ±0.792 milleq. di ac. acetico per M di alcool.

Questi ceppi, rispetto a quelli studiati nel 1956, si sono dimostrati un pò meno alcooligeni e un poco più produttori di ac. volatile.

Kl. magna

Anche *Kl. magna* è stata rinvenuta abbondante.

Studiati 28 ceppi questi hanno dato in media il 4.25 ± 0.165 di alcool e 14.9 ± 0.602 milleq. di ac. acetico per M di alcool.

Il rendimento alcoolico è stato molto più basso di quello offerto nel 1956 e la produzione di acidità volatile assai più elevata.

Pichia fermentans, P. membranaefaciens e Cand. pulcherrima

Per quanto si riferisce a queste ultime specie, saggiate in vari ceppi, il loro comportamento tecnologico si inquadra con quanto già è noto (5, 6).

Tab. IV - *Rendimento in alcool e produzione di acidità volatile in* Sacch. ellipsoideus

Ceppo	alcool %	acidità volatile			
		In gr/litro ac. acet.	In gr. ac. acet./100 cc alcool	In milleq. per litro	In millieq. per mol. di alcool
5 IIIa	13,1	0,67	0,52	11	5
5 IIIb	13,5	0,69	0,51	11,5	5
5 IIIc	12,8	0,89	0,70	15	7
5 IIId	13,5	0,71	0,53	12	5
6 IIIb	12,1	0,84	0,78	14	6,5
7 IIIb	13,0	0,60	0,46	10	5
7 IIId	13,8	0,27	0,2	4,5	2
9 IIIb	13,3	1,02	0,76	17	7,5
9 IIIc	12,5	0,89	0,71	15	7
10 IIIa	12,3	0,84	0,70	14	6,5
10 IIIc	11,7	1,31	1,12	22	10,5
10 IIId	12,8	0,73	0,57	12	5,5
11 IIIa	12,3	0,61	0,50	10	5
11 IIIb	12,3	0,81	0,66	13,5	6
11 IIIc'	12,2	1,30	1,06	21,5	10
11 IIId	11,6	1,46	1,27	24,5	12
12 IId	11,9	0,74	0,61	12,5	6
12 IIIb	12,6	0,83	0,66	14	6,5
12 IIIc	12,3	1,0	0,82	16,5	7,5
12 IIId	11,6	0,88	0,76	15	7,5
13 IIa	12,1	1,38	1,14	23	11
13 IIb	12,0	0,94	0,78	16	7,5
13 IId	12,6	0,93	0,74	15,5	7
13 IIId	13,8	0,84	0,61	16	7
14 IIIb	13,9	0,14	0,10	2,5	1
14 IIIb'	12,1	0,79	0,66	13	6
15 IIb	13,6	2,45	1,80	41	17,5

Segue Tab. IV.

Ceppo	alcool %	acidità volatile			
		In gr/litro ac. acet.	In gr. ac. acet./1000 cc. alcool	In millieq. per litro	In millieq. per mol. di alcool
15 IIc	13,0	0,59	0,45	10	4,5
17 IIb	15,0	0,61	0,47	10	4
17 IIc	15,9	0,41	0,26	7	2,5
17 IIIa	15,0	1,67	1,08	2	1
17 IIIb	16,1	0,57	0,36	9,5	3,5
17 IIIc	16,9	1,0	0,60	16,5	5,5
18 IIb	13,4	0,76	0,57	13	6
18 IIIc	12,8	1,35	1,06	22,5	10
18 IIId	13,5	0,83	0,61	14	6
19 IIb	12,7	1,42	1,12	24	11
19 IIc'	13,7	1,11	0,80	18,5	8
19 IIIa	13,0	0,88	0,68	15	6,5
19 IIIb	13,0	0,51	0,40	8,5	4
19 IIId	13,5	1,33	0,95	22	10
20 IId	15,5	0,90	0,58	15	5,5
20 IIIa	14,3	1,05	0,74	17,5	8
21 IIIb	13,7	0,56	0,40	9,5	4
21 IIIc	13,2	0,60	0,45	10	4,5
21 IIIe	13,4	0,90	0,67	15	6,5
22 IIIa	13,7	0,50	0,37	8,5	3,5
22 IIIb	14,4	0,86	0,59	14,5	6
22 IIIc	13,4	0,83	0,62	14	6
22 IIId	12,4	1,10	0,89	18,5	8
22 IIIe	12,1	1,50	1,24	25	12
22 IIIf	13,7	1,43	1,04	24	10
23 IIIc	15,5	0,65	0,41	11	4
	13,2±0,158				6,20±0,353

Tab. V - *Rendimento in alcool e produzione di acidità volatile in* Sacch. oviformis.

Ceppo	alcool %	acidità volatile			
		In gr./litro di ac. acetico	In gr. di ac. acet./100 cc. di alcool	In millieq. per litro	In millieq. per mol di alcool
6 IIIa	12,7	0,77	0,60	13	6
6 IIIc	12,0	1,02	0,85	17	8
9 IIIa	12,4	1,08	0,87	18	8,5
11 IIIc	12,3	1,25	1,01	21	9
15 IIIa	12,9	1,03	0,80	17	7,5
15 IIId	13,6	1,03	0,76	17	7
17 IIa	14,2	0,80	0,56	9,5	4
18 IIc	12,6	0,52	0,40	8,5	4
19 IIa	14,1	0,87	0,61	14,5	6
19 IIIc	13,3	0,90	0,67	15	6,5
21 IIIa	14,4	1,02	0,71	17	7
	13,2±0,061				6,5±0,426

Tab. VI - *Rendimento in alcool e produzione di acidità volatile in* Sacch. carlsbergensis.

Ceppo	alcool %	acidità volatile			
		In gr./litro ac. acetico	In gr. di ac. acet./100 cc. di alcool	In millieq. per litro	In millieq. per mol. di alcool
11 IIIe	11,4	0,82	0,54	10,5	5,5
12 IIa	12,6	0,92	0,73	15,5	7
13 IIIa	13,6	0,76	0,56	13	5,5
15 IIa	11,6	—	—	—	—
15 IId	13,7	0,71	0,51	12	5
15 IIIb	13,3	0,50	0,37	8,5	4
15 IIIc	12,3	0,91	0,74	15	7
18 IIa	13,6	1,48	1,09	25	9,5
18 IIIa	12,4	1,65	1,33	27,5	13
21 IIId	12,3	0,81	0,66	13,5	6,5
23 IIIb	13,4	0,80	0,60	13	6
	12,75±0,260				6,9±0,787

Tab. VII - *Rendimento in alcool e produzione di acidità volatile di varie specie di* Saccharomyces.

Specie e ceppo	alcool %	acidità volatile			
		In gr./litro di ac. acetico	In gr. di ac. acet. per 100 cc di al.	In millieq. per litro	In millieq. per mol. di alcool
S. italicus					
1 IIa'	12,2	1,01	0,83	16,5	8
1 IIb'	12,7	1,40	1,10	23,0	10,5
1 IIe'	12,9	1,11	0,86	18,5	8
17 IIId	14,9	1,73	1,16	29,0	11
20 IId	12,4	0,83	0,67	14,0	6,5
S. transvaal.					
20 IIa	12,0	0,91	0,75	15,0	7
S. steineri					
18 IIIb	11,8	1,53	1,30	25,5	13
S. fructuum					
12 IIb	12,2	1,01	0,83	17,0	8
13 IIc	12,3	0,84	0,68	16,0	7,5
S. microellip.					
12 IIIa	12,9	0,68	0,63	11,5	5
S. rosei					
2 IIIa	9,1	0,16	0,17	3	2
2 IIIb	8,2	0,22	0,26	4	3
2IIId	9,0	0,28	0,31	5	3
16 IIIb	8,0	0,07	0,09	1	7
S. veronae					
16 IIIc	7,4	0,04	0,05	1,0	8

Tab. VIII - *Rendimento in alcool e produzione di acidità volatile in* Kl apiculata.

Ceppo	alcool %	acidità volatile			
		In gr./litro di ac. acet.	In gr. di acido acetico/ 100 cc. di	In millieq. per litro	In millieq. per mol. di alcool
1 Ia	4,1	0,63	1,54	10,5	15
1 Ib	4,1	0,63	0,54	10,5	15
2 IIa	3,6	0,81	2,27	13,5	20
4 Ia	3,5	0,62	1,80	10,5	17
4 Ic	3,6	1,30	1,72	10,5	17
4 IIb	3,6	0,70	1,96	12,0	20
4 IIc	3,6	0,45	1,25	7,5	12
5 Ia	3,5	0,51	1,43	8,5	14
5 Ic	3,3	0,63	1,85	10,5	18
6 IIb	4,4	0,85	1,92	14,0	13
7 Ib	6,7	0,89	1,32	15,0	13
8 Ia	4,1	0,71	1,75	12,0	17
12 Ia	3,5	0,82	2,34	13,5	25,5
16 I b	3,9	0,83	2,10	14,0	20,5
16 IIa	4,5	0,76	1,70	13,0	17
17 Ia	3,6	0,77	0,21	13,0	21
17 Ib	4,2	0,67	1,61	11,0	15
17 Ic	3,5	0,66	1,90	11,0	20
17 Id	4,2	0,84	2,0	14,0	20
18 Ia	6,3	0,80	1,27	13,5	12,5
18 Id	5,6	0,70	1,25	12,5	10,5
	4,16±0,203				17,04±0,792

Tab. IX - *Rendimento in alcool e produzione di ac. volatile in* Kl. magna.

Ceppo	Alcool %	acidità volatile			
		In gr./litro di ac. acet.	In gr. di acido acet./100 cc. di alcool	In millieq. per litro	In millieq. per mol. di alcool
1 Ic	4,3	0,62	1,44	10,5	14
1 Id	3,4	0,73	2,13	12,0	20
1 IIa	3,8	0,68	1,78	11,5	17
1 IIc	3,8	—	—	—	—
2 Ia	4,1	0,83	2,0	14	20
2 Ib	4,2	0,70	1,66	12	16,5
2 Ic	3,8	0,81	2,13	13,5	20
2 IIb	3,9	0,60	1,52	10	14,5
2 IIc	3,7	0,80	2,16	13,5	21
4 IIIc	4,3	0,52	1,0	8,5	11,5
5 Ib	3,6	0,55	1,53	9	14,5
5 Id	3,2	0,52	1,60	9	16
5 IIa	3,7	0,63	1,70	10,5	16
5 IIb	3,2	0,62	1,90	10,5	18,5
5 IIc	3,1	0,54	1,70	9	16,5
6 Ic	4,3	0,75	1,50	12,5	17
6 IIa	4,4	0,78	1,77	13	17
6 IIc	4,6	0,50	1,09	8,5	10,5
7 IIb	7,5	0,68	0,91	11,5	9
7 IIc	6,1	1,02	1,66	17	16
8 Ib	4,1	0,54	1,30	9	12
8 Ic	1,0	—	—	—	—
8 IIa	4,5	0,55	1,21	9	11
8 IIb	4,2	0,62	1,49	10,5	14,5
13 Ia	4,1	0,71	1,73	12	15
13 Ic	4,7	0,65	1,38	11	13,5
19 Ic	5,3	0,77	1,45	13	14
20 Ia	4,2	0,84	2,02	14	20
	4,25±0,165				14,9±0,602

Tab. X - *Rendimento in alcool e produzine di ac. volatile in* P. fermentans, P. membranafactens *e* Tr. beherendii.

Ceppo	alcool %	acidità volatile			
		In gr./litro di ac. acet.	In gr. di acido acet./100 cc. di alcool	In millieq. per litro	In millieq. per mol. di alcool
P. fermentans					
1 IIb	6,1	0,57	0,93	6,5	6
1 IId'	6,7	0,59	0,88	10	8,5
1 IIb'$_1$	6,4	0,59	0,93	10	8,5
7 Ia	4,4	0,19	0,43	3	4
7 IIa	4,2	0,11	0,26	2	3
7 IId	5,3	0,22	0,41	4	4,5
7 IIIa	7,1	0,41	0,58	7	5,5
7 IIIc	7,1	0,46	0,64	7,5	6
12 Ic	5,0	0,13	0,26	2	2,5
12 Ic'	4,3	0,13	0,30	2	2,5
14 IIIa	—	0,21	—	—	—
14 IIIc	—	0,33	—	—	—
19 IId	6,9	0,52	0,75	8,5	7
	5,8 ± 0,369				4,9 ± 0,583
P. membran.					
4 IIIb	—	0,27	—	—	—
14 IIIb	1,5	0,19	1,27	3	11,5
8 IIa'	—	—	—	—	—
Tr. beherendi					
8 Id	2,3	0,13	0,55	2	5

Tab. XI - *Rendimento in alcool e produzione di ac. volatile in* C. pulcherrima.

Ceppo	alcool %	acidità volatile			
		In gr./litro di ac. acet.	In gr. di acido acet./100 cc. di alcool	In millieq. per litro	In millieq. per mol. di alcool
3 Ia	1,3	0,07	0,55	1	4,5
3 Ib	2,1	0,07	0,33	1	3
3 IIa	1,1	0,15	1,3	2,5	12,5
3 IIb	1,1	0,07	0,65	1	5,5
3 IIc	2,1	0,07	0,32	1	3
3 IId	1,2	0,15	1,24	2,5	12
4 Ib	2,1	0,15	0,73	2,5	7
8 IIc	4,4	0,79	1,80	13	17
8 IIe	3,9	0,16	0,41	3	4,5
18 Ic	3,0	—	—	—	—
19 Ib	—	—	—	—	—
19 Id	3,0	0,13	0,42	2	4
20 Ic	1,7	0,15	0,9	2,5	8,5
20 I d	4,5	0,57	1,28	9,5	12,5
	2,4±0,313				7,2±1,032

Conclusioni

1 - Esaminata la fisionomia zimologica dei tre principali momenti della fermentazione violenta si osserva come, all' inizio, dominino in misura esclusiva i lieviti apiculati con una frequenza pari al 70% circa e rappresentati sia da *Kl. apiculata* che da *Kl. magna*. Presente anche, in discreta percentuale, *Candida pulcherrima* e *Pichia fermentans*. Praticamente assenti sono risultati i lieviti ellittici.

Durante il corso della fermentazione il numero degli apiculati si riduce, permenando tuttavia notevole. Permangono altresì, senza subire variazioni notevoli nelle percentuali di frequenza, *Candida pulcherrima* e *Pichia fermentas*.

Peraltro, durante questa fase, figura presente anche *Sacch. ellipsoideus* accompagnato, in maggior numero, da *Sacch. oviformis, Sacch. carlsbergensis* e altri Saccaromiceti.

Sul finire della fermentazione la percentuale dei lieviti e metabolismo decisamente fermentativo domina come conseguenza di un ragguardevole

aumento sia del lievito ellittico che degli altri Saccaromiceti. Con tutto ciò permane una piccola percentuale di lieviti apiculati e di *Pichia*.

2 - Il confronto con i dati raccolti nel 1955 e nel 1956 mette in rilievo, ancora una volta, la grande mutevolezza del quadro zimologico da un anno ad un altro.

Con riferimento al 1956 si osserva poi in particolare come, durante il 1957 la facies zimologica dei mosti del Peloponneso sia risultata notevolmente più scadente di quella dell'anno precedente. Tanto che essa non è apparsa molto soddisfacente al buon andamento del processo fermentativo.

3 - N°. 165 ceppi sono stati saggiati tecnologicamente nel loro rendimento alcoolico e nella produzione di acidità volatile.

Per quanto si riferisce al rendimento alcoolico esso è stato trovato per tutti i ceppi inferiore a quello dato dai ceppi isolati nel 1956.

Raggruppando in classi i rendimenti delle varie specie e ceppi i dati ottenuti hanno consentito di costruire il diagramma di Fig. 4, figura nella quale è riportato anche il diagramma del 1956.

Questi due diagrammi appaiono del tutto diversi ancorchè si ripetano, nell'uno e nell'altro, tre punte caratteristiche.

Nel 1957 la prima punta assume valori maggiori e la seconda minori. Sono le punte date dai lieviti apiculati. L'emergenza della prima sulla seconda è dovuta a minore rendimento alcoolico registrato per *Kl. magna*.

Per quanto si riferisce alla terza punta, rappresentata dal rendimento alcoolico degli ellittici, essa indica una dominanza di ceppi a più basso rendimento alcoolico rispetto al 1956.

Anche sotto questo punto di vista il 1957 si è presentato dunque inferiore zimologicamente e zimotecnicamente, al 1956.

Riassunto. — *In continuazione di precedenti studi sono state eseguite, anche durante la vendemmia 1957, alcune ricerche sopra i lieviti partecipanti alla fermentaizone vinaria nella zona del Poleponneso.*

Sono stati isolati 190 ceppi in tre diversi momenti del processo fermentativo e diagnosticati nelle seguenti specie:

1 Sacch. cerevisiae *var.* ellipsoideus (*Hansen*) *Dekker*
2 » oviformis *Ost.*
3 » carlsbergensis *Hansen*
4 » italicus *Cast.*
5 » rosei (*Guill.*) *Lodder et Kreger-van Rij*

6 » fructuum *Lodder et Kreger-van Rij*
7 » microellipsodes *Ost.*
8 » steineri *Lodder et Kreger-van Rij*
9 » transvaalensis *v. d. Walt*
10 » veronae *Lodder et Kreger-van Rij*
11 Kloeckera apiculata (*Reess*) *Janke*
12 » magna (*de' Rossi*) *Janke*
13 » jensenii (*Kl.*) *Janke*
14 Pichia fermentans *Lodder*
15 » membranaefaciens *Hansen*
16 Candida pulcherrima (*Lindner*) *Wind.*
17 Trichosporon behrendii *Lodder et Kreger-van Rij.*

La maggior parte di queste specie sono state peraltro isolate pochissime volte, anzi, in alcuni casi, una sola volta.

Il confronto con i dati raccolti nel 1955 e nel 1956 ha dimostrato come il quadro zimologico vari notevolmente ,anche nella regione esaminata, da anno ad anno. Sono cambiamenti, talvolta, relativamente profondi che difficile è spiegare.

Ad ogni modo durante il 1957 il carattere zimologico della zona è apparso meno soddisfacente di quello registrato nel 1956 per una minore e più tarda presenza di lieviti a metabolismo decisamente fermentativo ed un maggior numero e maggiore persistenza di lieviti appartenenti a specie di Kloeckera *e di* Pichia.

Per n°. 165 ceppi appartenenti alle varie specie è stato finalmente determinato il potere alcooligeno e la formazione di acidità volatile. Anche sotto il punto di vista del rendimento alcoolico il presente anno è stato inferiore al precedente.

Ringraziamento. — *Al Professore Onorato Verona che cortesemente ha voluto seguire, con il suo consiglio, il presente lavoro, rivolgiamo il più vivo ringraziamento.*

Résumé. — *Les auteurs ont encore poursuivi leur recherches sur les levures de vinification de la région nord du Péloponnèse. Cette fois leur étude a porté sur les levures isolées au cours des vendanges de l'automne 1957.*

A trois moments différents du processus fermentaire ont été isolées 190 souches qui ont été rapportées aux espèces suivantes:

1 Sacch. cerevisiae *var.* ellipsoideus (*Hansen*) *Dekker*
2 » oviformis *Ost.*
3 » carlsbergensis *Hansen*
4 » italicus *Cast.*
5 » rosei (*Guill.*) *Lodder et Kreger-van Rij*
6 » fructuum *Lodder et Kreger-van Rij*
7 » microellipsodes *Ost.*
8 » steineri *Lodder et Kreger-van Rij*
9 » transvaalensis *v. d. Walt*
10 » veronae *Lodder et Kreger-van Rij*
11 Kloeckera apiculata (*Reess*) *Janke*
12 » magna (*de' Rossi*) *Janke*
13 » jensenii (*Kl.*) *Janke*
14 Pichia fermentans *Lodder*
15 » membranaefaciens *Hansen*
16 Candida pulcherrima (*Lindner*) *Wind.*
17 Trichosporon behrendii *Lodder et Kreger-van Rij.*

Plusieurs de ces espèces ont été rarement isolées, quelques unes même une seule fois.

La comparaison des résultats obtenus cette fois avec ceux donnés par les levures isolées au cours des année 1955 et 1956, met de nouveau en évidence le fait que, même dans une même région, la microflore des raisin varie considérablement d'une année à l'autre. Il s'agit parfois de changements relativement profonds, qu'il n'est pas facile d'expliquer.

En tout cas, le caractère zymologique de l'année 1957 de la zone nord du Péloponnèse ,parait moins santisfaisan tque celui de la même région de l'année précédente, ceci étant dû d'une part à l'apparition plus tardive et à la présence moins importante des levures à métabolisme réellement fermentatif et d'autre part à un nombre plus important et une persistance plus grande des levures appartenant aux espèces Kloeckera *et* Pichia.

Des déterminations du pouvoir alcooligène et de l'acidité volatile produite ont été effectuées sud 165 souches. Les levures de l'année 1957se sont avérées, du point de vue de leur rendement en alcool également, moins satisfaisantes que celles de l'année précédente.

Nous vourdions exprimer ici nos très vifs remerciements à Monsieur le Professeur O. Verona qui a bien voulu suivre le cours de ce travail et nous aider de ses bons conseils.

Summary: — *A study of yeasts participating in wine fermentation has been continued on strains isolated during the 1957 wine-harvest in the northern region of the Peloponnesus.*

190 strains isolated at three different fermentation moments were found to belong to the following species:

1 Sacch. cerevisiae *var.* ellipsoideus (*Hansen*) *Dekker*
2 » oviformis *Ost.*
3 » carlsbergensis *Hansen*
4 » italicus *Cast.*
5 » rosei (*Guill.*) *Lodder et Kreger-van Rij*
6 » fructuum *Lodder et Kreger-van Rij*
7 » microellipsodes *Ost.*
8 » steineri *Lodder et Kreger-van Rij*
9 » transvaalensis *v. d. Walt*
10 » veronae *Lodder et Kreger-van Rij*
11 Kloeckera apiculata (*Reess*) *Janke*
12 » magna (*de' Rossi*) *Janke*
13 » jensenii (*Kl.*) *Janke*
14 Pichia fermentans *Lodder*
15 » membranaefaciens *Hansen*
16 Candida pulcherrima (*Lindner*) *Wind.*
17 Trichosporon behrendii *Lodder et Kreger-van Rij*

Many of these species were rarely found (some of them once only).

Comparing data obtained this time to those of the previous years, the authors observe that the zymological aspect varies from year to year. These sometimes quite remarkable changes are really not easy to explain.

Anyhow, the 1957 zymological character of the region examined appears less satisfactory than it was in 1956, because of the fact that this time properly fermentative yeats appeared later and were less numerous than usual, while Kloeckera *and* Pichia *species were more frequent and persisted longer on through the fermentation process.*

165 strains were tested for alcohol production capacity. Volatile acidity produced by each strain was also determinated. Mean alcohol yeald of Saccharomyces *specied was slightly lower in 1957 than in 1956.*

The authors wish to express their grateful thanks to Professor O. Verona for his valuable advice during this work.

BIBLIOGRAFIA

1) - Verona O., Picci, G., Melàs-Joannidis, Z. et Carri, I. - *Prime ricerche zimologiche sopra mosti d'uva fermentati della Grecia.* Ann. Fac. Agr. Pisa, 47, (1956).

2) - Melàs-Joannidis, Z.; Carni-Catsadimas, I.; Verona O. et Picci, G. - *Ricerche microbiologiche sopra i mosti d'uva in fermentazione nel Peloponneso.* Ann. Microb., VIII, 118, (1958).

3) - Verona, O. e Picci G. - *A new species of Trichosporon: Trichosporon hellenicum n. sp.* Ann. Microb., VIII, 106. (1958).

4) - Zardetto di Toledo, O.; Teixeira, C. G.; Verona O. - *Prime ricerche sopra i lieviti presenti sulle uve e nei mosti della regione viticola di S. Paolo (Brasile).* In corso di stampa in Ann. Microb.

5) - Rosemberg, J. A. - *Qualche ricerca intorno a Pichia fermentans Lodder.* Arch. f. Mikrob., 32, 346, (1959).

6) - Verona O. - *Qualche osservazione sulla fisiologia di Candida pulcherrima (Lindner) Wind. in rapporto alla fermentazione vinaria* - Ann. Fac. Agr. Pisa, X, 21 (1949).